



istituto zooprofilattico sperimentale

del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

La Biosicurezza nelle attività dei laboratori dedicati alle EST: **I Test Rapidi e le Prove di Conferma**

Elena Bozzetta

XXI Convegno degli IZZSS sulle Encefalopatie Spongiformi trasmissibili, Torino 27 Gennaio 2022





Definizioni

Biosafety: -Biosafety refers to “the containment principles, technologies and practices that are implemented to prevent unintentional exposure to pathogens and toxins, or their accidental release”-

≠

Biosecurity: -The term “biosecurity” refers to the “institutional and personal security measures designed to prevent the loss, theft, misuse, diversion or intentional release of pathogens and toxins”- (WHO)

Risk analysis: processo composto da: (hazard identification,) Risk assessment, Risk management e Risk communication.

«**Biosicurezza**»

Rischio: -probabilità di raggiungimento del livello potenziale di danno nelle condizioni di impiego o di esposizione ad un determinato fattore o agente oppure alle loro combinazioni- (DLgs 81/2008)



Perché è importante?



**1° caso,
Francia
2019**

Communiqué de presse - 27 juillet 2021

2 AGOSTO 2021 20:18

La Francia sospende gli studi sui prioni dopo che un altro ricercatore ha contratto la malattia

«La persona affetta da CJD (...) è un agente INRAE in pensione (**3° caso – a seguire**). Questo potrebbe essere il secondo caso di CJD infettiva che colpisce uno scienziato che ha lavorato sui prioni, dopo quello di un'assistente ingegnere deceduta per la malattia nel 2019, e che è rimasta ferita nel 2010 durante un esperimento*1»

<https://www.inrae.fr/actualites/suspension-provisoire-travaux-prions-laboratoires-recherche-publics-francais>



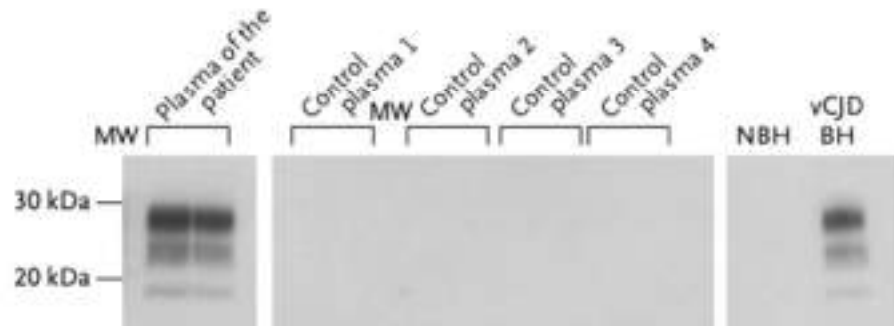
Variant Creutzfeldt–Jakob Disease Diagnosed 7.5 Years after Occupational Exposure

*1

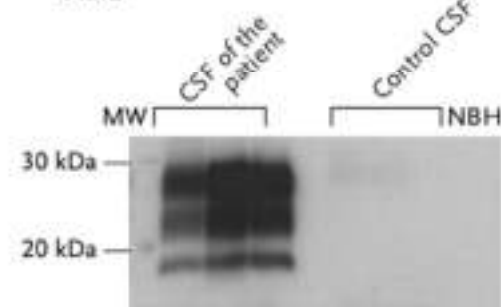
- Maggio 2010: una **operatrice** di un laboratorio di ricerca sui prioni di **24 anni** si ferisce il pollice con delle forbici – attraverso un doppio paio di guanti monouso – senza notare sanguinamento.
- L'operatrice stava lavorando su sezioni cerebrali di topo transgenico overesprimente PrP umana con metionina al codone 129.
- Novembre 2017: iniziano a mostrarsi i primi sintomi: la – oramai – ex operatrice accusa forti dolori alla spalla destra e al collo; nei seguenti 6 mesi la manifestazione algica risulta ingravescente e progressivamente si irradia a tutta la metà destra del corpo.
- Gennaio 2019: compaiono alternativamente stati di depressione e d'ansia, deficit della memoria, allucinazioni visive, ipertono del lato corporeo afflitto.
- La paziente muore a 19 mesi dalla comparsa della sintomatologia.

Variant Creutzfeldt–Jakob Disease Diagnosed 7.5 Years after Occupational Exposure

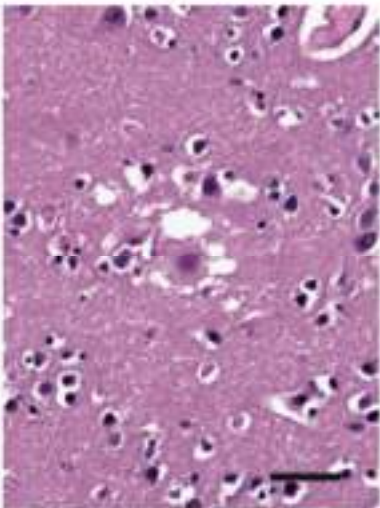
A Abnormal Prion Protein in Plasma



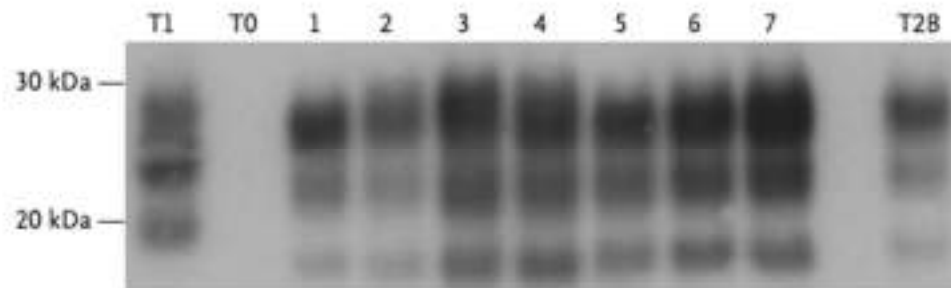
B Abnormal Prion Protein in Cerebrospinal Fluid



C Neuropathological Evidence of Variant CJD



D Typing of Protease-Resistant Prion Protein



- A: risultati della PMCA da plasma;
- B: risultati di 3 round di PMCA: (sn-dx) CSF della paziente, controllo e NBH;
- C: reperto istologico post mortem (colorazione E-E);
- D: WB da matrice cerebrale.



Recherche sur les prions, la sécurité des laboratoires français mise en cause

6/12/2021



Research on prions, the safety of French laboratories questioned

VENTUM 5/01/2022



2° caso,
Francia
2021



- Pierette C., 67 anni, ex operatrice presso un laboratorio di ricerca del Toulouse National Veterinary School (ENVT), a marzo 2021 inizia a mostrare sintomatologia depressiva, stati confusionali, astenia;
- Si ritiene che possa essere affetta da Morbo di Alzheimer;
- Dopo mesi si arriva alla diagnosi definitiva: vCJD;
- A luglio il fatto viene reso pubblico;
- La donna muore il 4 novembre 2021.



1° caso (?),
2016



Perché è importante?



Registri e Sorveglianze
Registro nazionale della malattia di Creutzfeldt-Jakob e sindromi correlate

MALATTIA DI CREUTZFELDT-JAKOB (MCJ) E SINDROMI CORRELATE IN ITALIA (aggiornata al 31 gennaio 2021)

SEGNALAZIONI CASI SOSPETTI		DECESSI CASI CON DIAGNOSI CERTA O PROBABILE DI MCJ							
Anno	Segnalazioni	Anno	MCJ sporadica	Forme genetiche			MCJ iatrogena ³	MCJ variante ⁴	Totale (decessi)
				MCJ genetica	GSS ²	FFI ²			
1993	51	1993	27	6	1	2	0	0	36
1994	62	1994	33	7	0	1	0	0	41

2015	280	2015	123	31	6	0	0	0	160
2016	244	2016	108	22	2	0	0	1	133
2017	305	2017	147	24	1	1	1	0	174
2018	295	2018	138	19	2	1	0	0	159
2019	306	2019	85	14	0	1	0	0	100
2020	275	2020	61	9	3	0	1	0	74
2021	15	2021	1	0	0	0	0	0	1
Totale (segnalazioni)	5636	Totale (Casi)	2442	470	62	18	11	3	3006



CORRIERE DELLA SERA

Perché è importante?

Covid, Pocchiari: «Virus sfuggito dal laboratorio? È successo anche per la mucca pazza»



Caso italiano, 2016

...ancora:

«Il tecnico di laboratorio sviluppa una condizione cerebrale fatale dopo un incidente con campioni di malattia della mucca pazza»

<https://it.pedeorelha.com/article/lab-tech-develops-fatal-brain-condition-after-accident-with-mad-cow-disease-samples>

«Lab tech develops fatal brain condition after accident with 'mad cow disease' samples»

<https://www.livescience.com/mad-cow-disease-lab-accident-vCJD.html>

Il neuroscienziato: «Gli incidenti che avvengono su materiali infetti a volte passano inosservati».

I casi di tre ricercatori morti per aver contratto la variante della malattia neurologica dei bovini

-(...) E la vittima italiana?

«Nell'articolo inglese c'è un accenno alla storia di una paziente morta nel 2016 con la variante. Aveva avuto contatti in laboratorio con materiale infetto di BSE o variante di Creutzfeldt-Jakob, ma non si è mai capito come possa essersi contaminata. È la conferma che tante volte nei rendiconti dei laboratori non si trova traccia di incidenti proprio in quanto possono passare inosservati anche al ricercatore»-

https://www.corriere.it/cronache/21_ottobre_23/coronavirus-pocchiari-virus-sfuggito-laboratorio-successo-anche-la-mucca-pazza-3002b3da-342c-11ec-93a1-3d25dcfcc17e.shtml

Grande impatto mediatico





Diagnosi TSE: «***Principi di biosicurezza applicabili ai laboratori Test Rapidi inseriti nel programma di sorveglianza epidemiologica delle encefalopatie spongiformi trasmissibili. Aggiornamento Linee Guida***».

Nota 0006558-15/03/2021-DGSAF-MDS-P

- **AGGIORNAMENTI NORMATIVI {slide successive}**
- **PROCEDURE di DECONTAMINAZIONE (STRUMENTI e SUPERFICI)**
 - **GESTIONE delle ESPOSIZIONI**
- **PROGETTAZIONE e CARATTERISTICHE TECNICHE dei LABORATORI**
 - **PROCEDURE di LAVORO**
 - **PULIZIA e DISINFEZIONE**



Linee Guida Biosicurezza 1/2

Aggiornamento Legge 18/12/2020 n. 176

Misure di contenimento	Livello di contenimento *2	
	2	3
1. Il luogo di lavoro deve essere separato da qualsiasi altra attività svolta nello stesso edificio	No	Raccomandato
2. Il luogo di lavoro deve essere sigillabile in modo da consentire la fumigazione	No	Raccomandato
3. Il materiale infetto, compreso qualsiasi animale, deve essere manipolato in cabine di sicurezza o in condizioni di isolamento o di adeguato contenimento	Se del caso	Si, in caso di infezione trasmessa per via aerea
4. L'aria in entrata e in uscita dal luogo di lavoro deve essere filtrata con un sistema di filtrazione HEPA ⁽¹⁾ o simile	No	Si, per l'aria in entrata e in uscita
5. Superfici impermeabili all'acqua e facili da pulire	Si, per bancone e pavimento	Si, per bancone, pavimento e altre superfici determinate nella valutazione
6. Il luogo di lavoro deve essere mantenuto a una pressione negativa rispetto alla pressione atmosferica	No	Raccomandato
7. Superfici resistenti ad acidi, alcali, solventi e disinfettanti	Raccomandato	Si

Nuova tabella (Allegato XLVII)

La scelta del livello di Biosicurezza per le attività di manipolazione di materiali potenzialmente infetti da prioni dipende dalla natura dell'agente, dei campioni da studiare e dalle attività che si effettuano.

D. Lgs 81/2008 e ss. mm.: XLVI gli agenti delle EST sono classificati come nel gruppo di rischio 2 (scrapie) e nel gruppo di rischio 3** (BSE ed altre TSE degli animali a queste associate).

Gli agenti classificati nel gruppo 3 ed indicati con doppio asterisco (**) possono comportare un rischio di infezione limitato perché normalmente non sono veicolati dall'aria, per cui si applicano i livelli di contenimento indicati nei riquadri.

VS

	2	3
1. La zona di lavoro deve essere separata da qualsiasi altra attività nello stesso edificio	No	Raccomandato
2. L'aria immessa nella zona di lavoro e l'aria estratta devono essere filtrate attraverso un ultrafiltro (HEPA) o un filtro simile	NO	Si, sull'aria estratta
3. L'accesso deve essere limitato alle persone autorizzate	Raccomandato	Si
4. La zona di lavoro deve poter essere chiusa a tenuta per consentire la disinfezione	No	Raccomandato
5. Specifiche procedure di disinfezione	Si	Si
6. La zona di lavoro deve essere mantenuta ad una pressione negativa rispetto a quella atmosferica	No	Raccomandato
7. Controllo efficace dei vettori, ad esempio, roditori ed insetti	Raccomandato	Si

(Vecchia tabella, ex All. XLVII)

*2 Il livello di contenimento 4 viene omissso (non di interesse/pertinenza)



Linee Guida Biosicurezza ^{2/2}

Aggiornamento Legge 18/12/2020 n. 176

8. L'accesso deve essere limitato soltanto agli operatori addetti	Raccomandato	Si	<input type="checkbox"/>
9. Controllo efficace dei vettori, per esempio roditori e insetti	Raccomandato	Si	<input type="checkbox"/>
10. Procedure specifiche di disinfezione	Si	Si	<input type="checkbox"/>
11. Stoccaggio in condizioni di sicurezza dell'agente biologico	Si	Si	<input type="checkbox"/>
12. Il personale deve fare una doccia prima di uscire dall'area di contenimento	No	<input type="checkbox"/>	Raccomandato
13. Processo di inattivazione convalidato per lo smaltimento sicuro delle carcasse di animali	Raccomandato	Si, su <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14. Il laboratorio deve contenere la propria attrezzatura	No	<input type="checkbox"/>	Raccomandato
15. Presenza di una finestra di osservazione, o di una soluzione alternativa, che consenta di vedere gli occupanti	Raccomandato	Raccomandato	<input type="checkbox"/>

Nuova tabella (Allegato XLVII)

I principali rischi correlati alle attività diagnostiche rapide per la rilevazione della PrP^{RES} sono rappresentati dalle ferite da taglio, dall'inoculazione e ingestione accidentale.

Il personale operante presso i laboratori deve attenersi scrupolosamente alle **Buone Pratiche di Laboratorio.**

Nella tabella, «*raccomandato*» significa che le misure dovrebbero essere applicate in linea di principio, a meno che i risultati della valutazione del rischio non indichino il contrario

(1) HEPA: filtro anti-polline ad alta efficienza

* ALLEGATO XLVII del D.lgs. n. 81/2008 come modificato dal D.L. 9/11/2020 n. 149 - Specifiche sulle misure di contenimento.

† per gli agenti appartenenti alla classe 3**, sulla base dell'analisi del rischio, per le misure di cui ai punti 3 e 4 (6a corsiva) può essere sufficiente assicurare livelli di contenimento previsti per gli agenti del gruppo 2.

Studi sperimentali indicano una **possibile trasmissibilità per inalazione di alcune malattie prioniche.** In via precauzionale, l'omogeneizzazione dei tessuti cerebrali (potenzialmente o sicuramente contaminati) deve essere eseguita in sistemi a tenuta posti all'interno di idonee cappe di biosicurezza al fine di contenere un'eventuale produzione di gocce e/o aerosol.

VS

8. Superfici idrorepellenti e di facile pulizia	Si, per il banco di lavoro	Si, per il banco di lavoro e il pavimento
9. Superfici resistenti agli acidi, agli alcali, ai solventi, ai disinfettanti	Raccomandato	Si
10. Deposito sicuro per agenti biologici	Si	Si
11. Finestra d'ispezione o altro dispositivo che permetta di vedere gli occupanti	Raccomandato	Raccomandato
12. I laboratori devono contenere l'attrezzatura a loro necessaria	No	Raccomandato
13. I materiali infetti, compresi gli animali, devono essere manipolati in cabine di sicurezza, isolatori o altri adeguati contenitori	Ove opportuno	Si, quando l'infezione è veicolata dall'aria
14. Inceneritori per l'eliminazione delle carcasse degli animali	Raccomandato	Si (disponibile)
15. Mezzi e procedure per il trattamento dei rifiuti	Si	Si
16. Trattamento delle acque reflue	No	Facoltativo

(Vecchia tabella, ex All. XLVII)



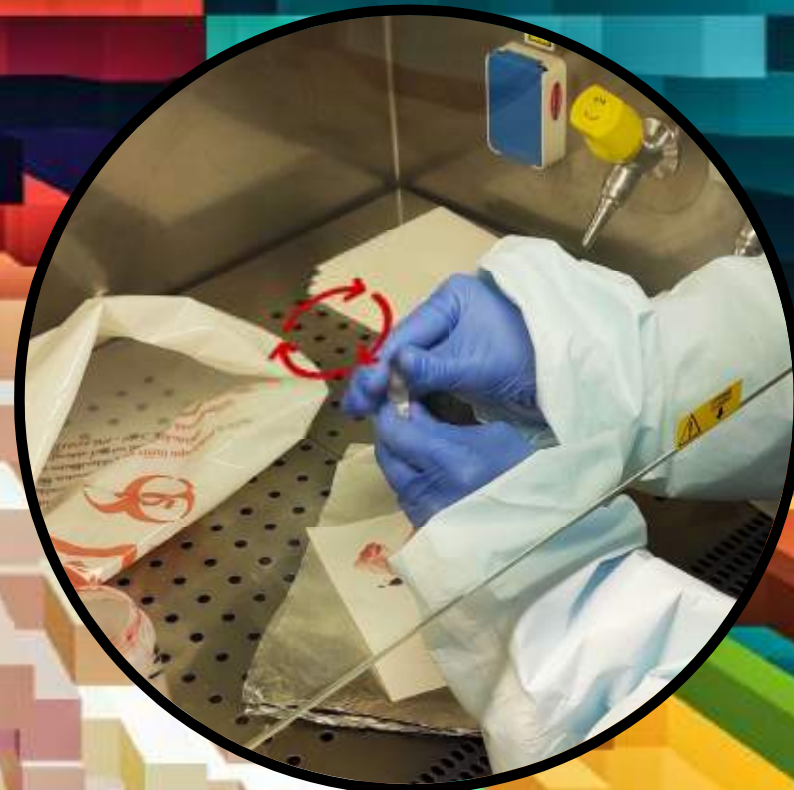
Prelievo dell'encefalo





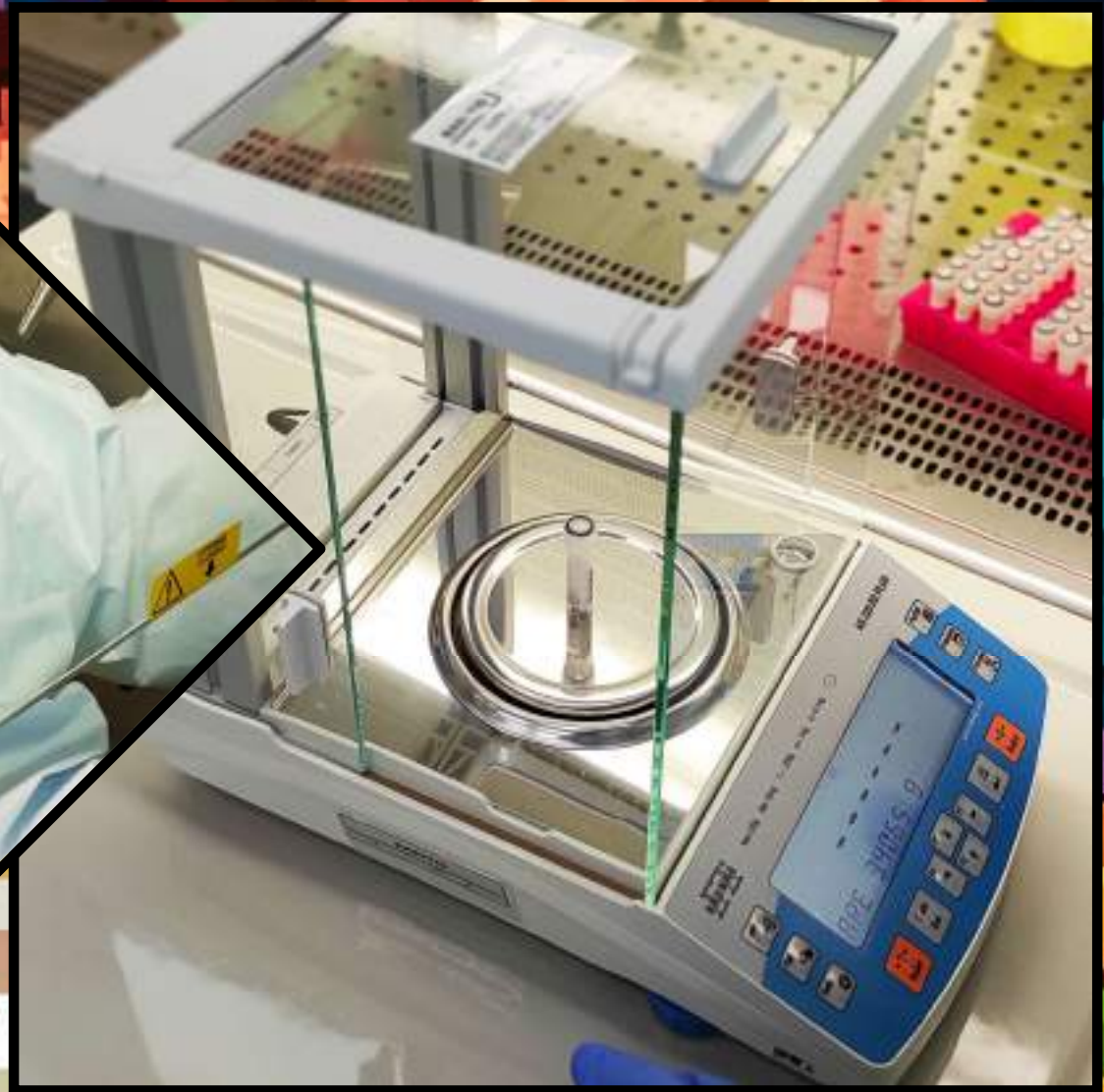
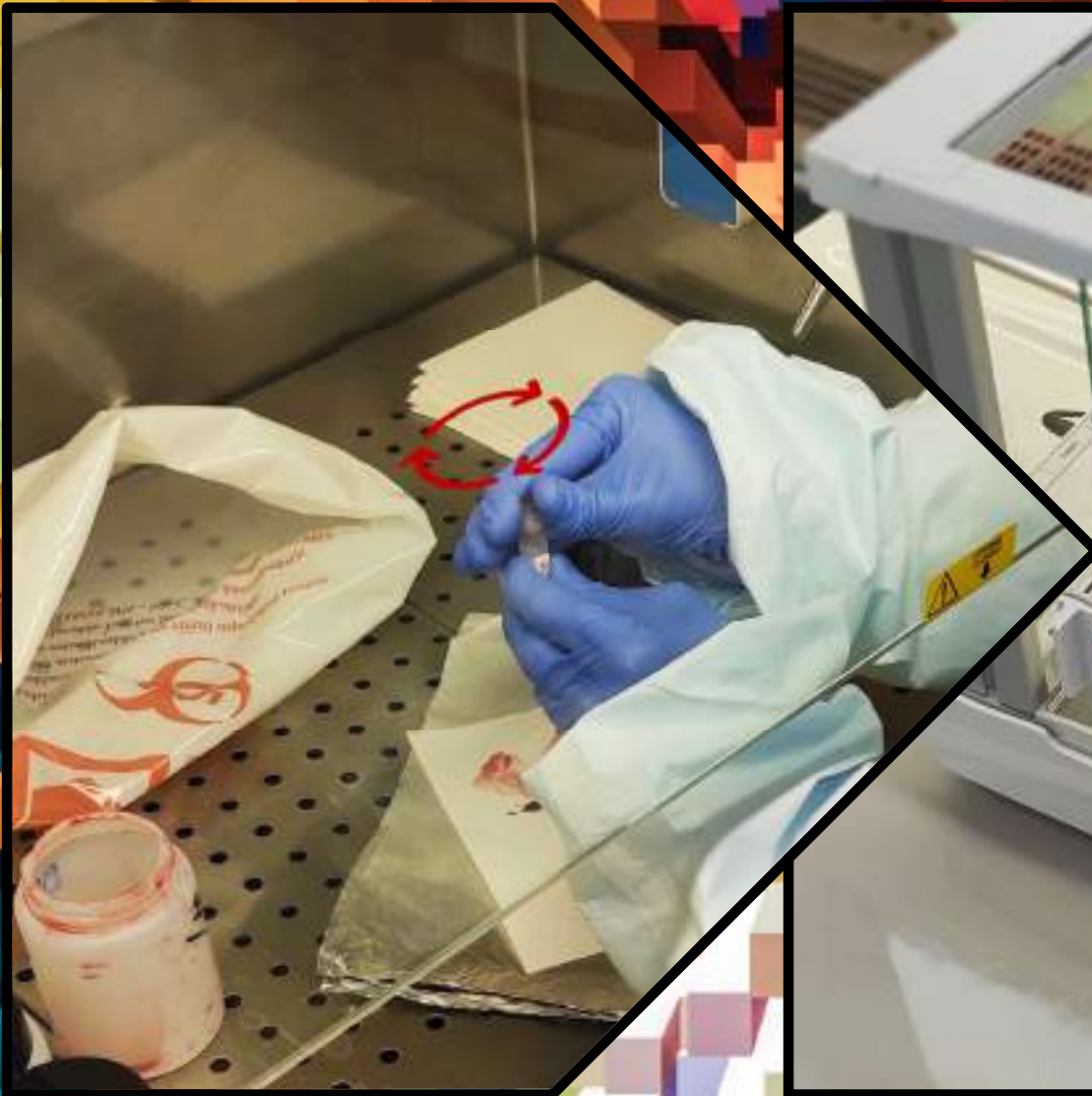


Test Rapidi





Test Rapidi

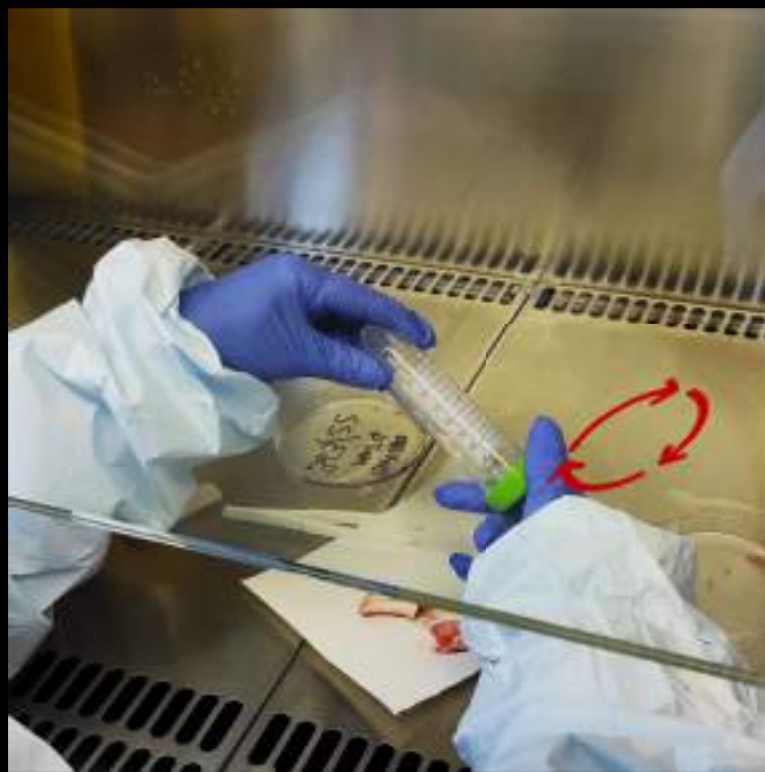






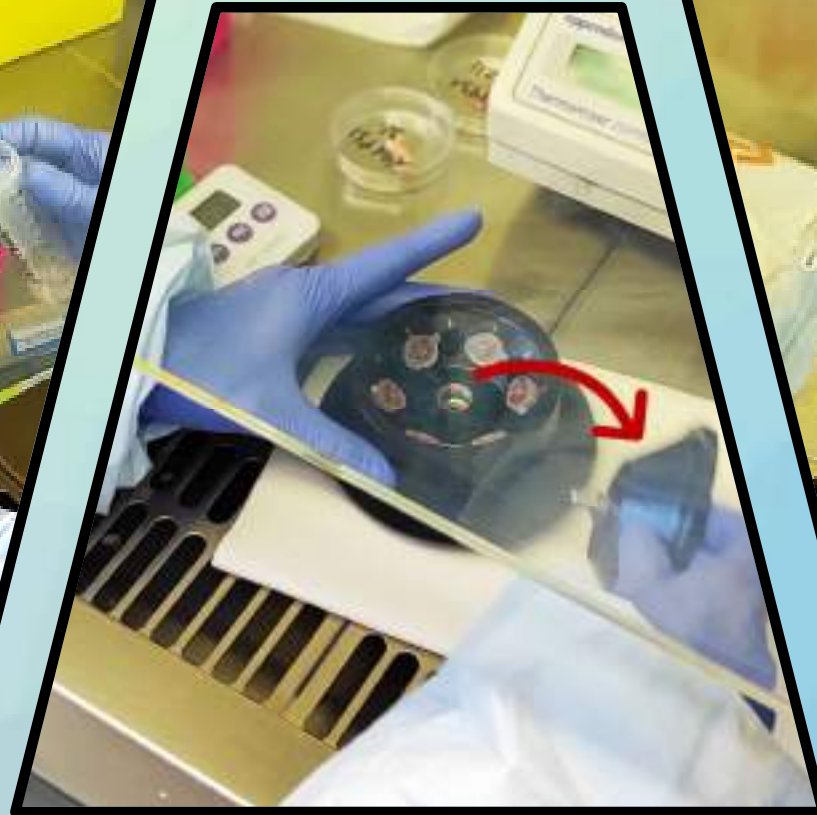
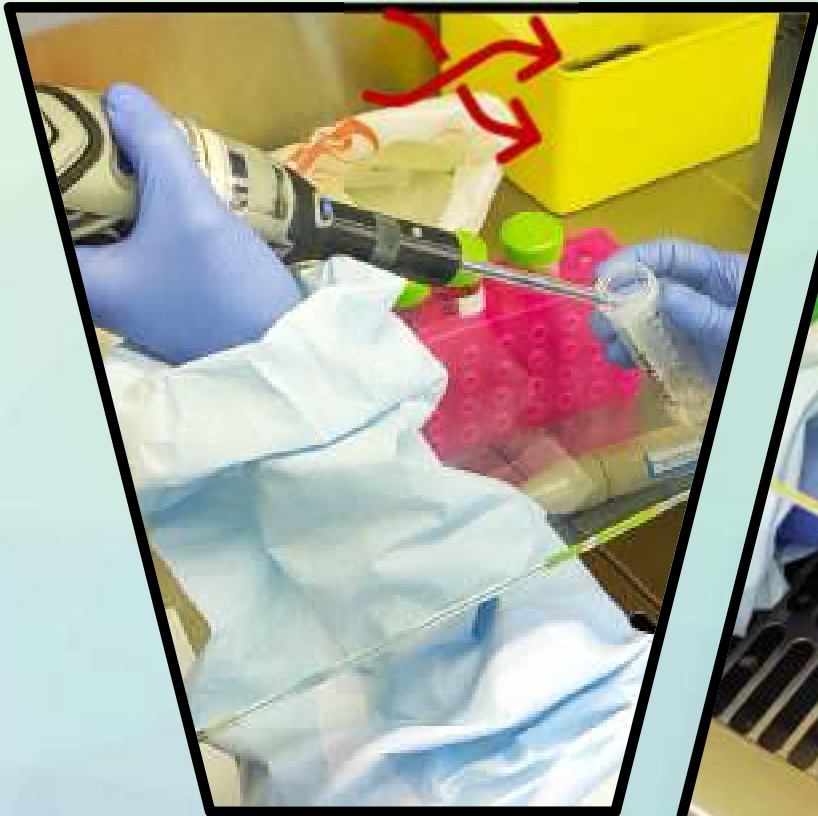


WB





WB





IHC/Istologia





IHC/Istologia





IHC/Istologia



NaClO



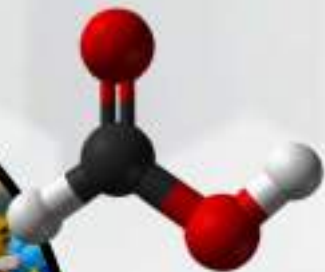


IHC/Istologia





Rischio chimico



8-100ML
2-Mercaptoethanol, $\geq 98\%$





Trasporto Campioni

Campione, luogo del prelievo → Laboratorio di analisi (trasporto esterno)/Trasporto interno (intra-murale): importanza sia per la sicurezza degli addetti al trasporto sia per i destinatari dei campioni, ma anche per la **conservazione dei campioni** stessi (e quindi per la qualità del risultato analitico).

Concetto di **BIOPROTEZIONE**: estensione al normale approccio alla biosicurezza volta a difendere, in un'ottica *One Health*, i laboratori, la popolazione, il patrimonio zootecnico, l'agricoltura e l'ambiente da atti di sabotaggio.

Risulta necessaria, in primis, una corretta **tracciabilità**.

Rigide norme nazionali ed internazionali (in particolare l'ADR) che mirano soprattutto a ridurre la probabilità di **danneggiamento dei contenitori**.

CLASSIFICAZIONE delle SOSTANZE INFETTIVE:

- **CATEGORIA A** (UN2814/UN 2900);
- **CATEGORIA B** (UN3373).



Trasporto Campioni

Contenitore triplo:

- **Involucro primario:** a tenuta stagna e dotato di etichetta descrittiva del contenuto;
- **Involucro intermedio** (secondario): serve a chiudere e proteggere il primo imballaggio; anch'esso a tenuta stagna, può ospitare uno o più involucri primari;
- **Involucro esterno** (terziario): protezione fisica da danneggiamenti.

+

Specifica documentazione d'accompagnamento (che attesti le informazioni sulla natura del campione trasportato, la sua identificazione nonché le generalità di mittente e destinatario).

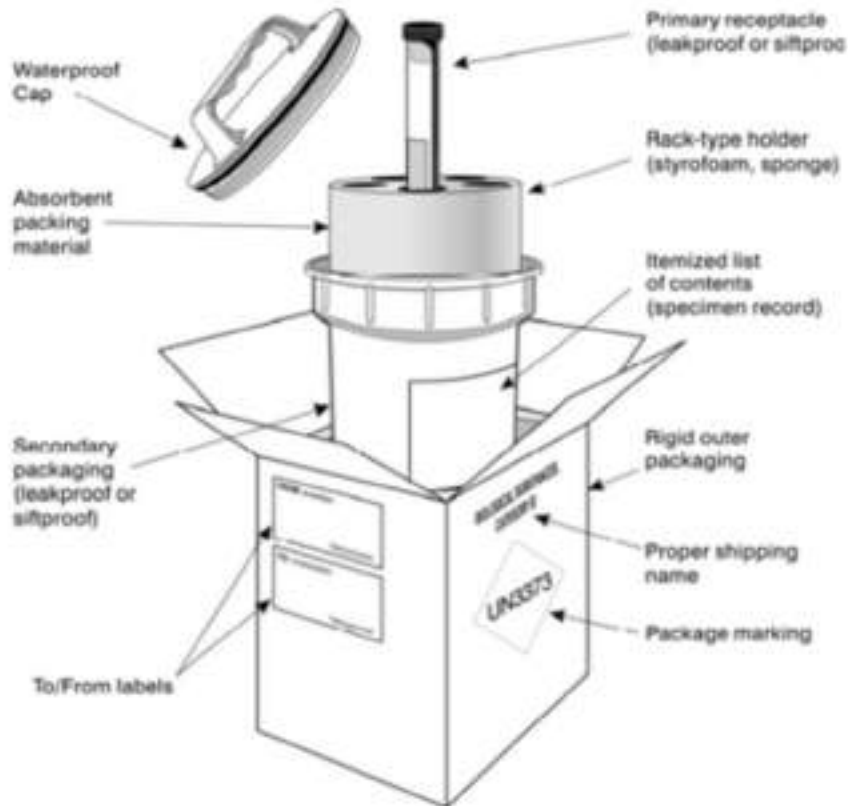


Immagine: Confezionamento UN 3373



Gestione Rifiuti

Rifiuti da attività diagnostica sui prioni:

- **Rifiuti SOLIDI:** l'incenerimento è utile quando è necessario sbarazzarsi di carcasse animali, di parti anatomiche e di altri rifiuti del laboratorio, con o senza decontaminazione precedente. L'incenerimento di materiali infetti è un'alternativa all'autoclave e viene operato da aziende specializzate;
- **Rifiuti LIQUIDI:** rifiuti liquidi infetti contaminati con prioni devono essere trattati per 1 h con sodio ipoclorito contenente cloro libero alla concentrazione finale di 20 g/l (2%) o con sodio idrossido 2M.

Per ulteriori informazioni si rimanda sempre alla

Nota 0006558-15/03/2021-DGSAF-MDS-P



OIE SRR ABU DHABI WEBINAR

BIO SAFETY AND BIOSECURITY

ABU DHABI 1ST – 2ND FEBRUARY 2022

<https://oie.zoom.us/meeting/register/tJYqfu-gqzgrG9Dff39Z4gPbSSYqD6r7YZXC>







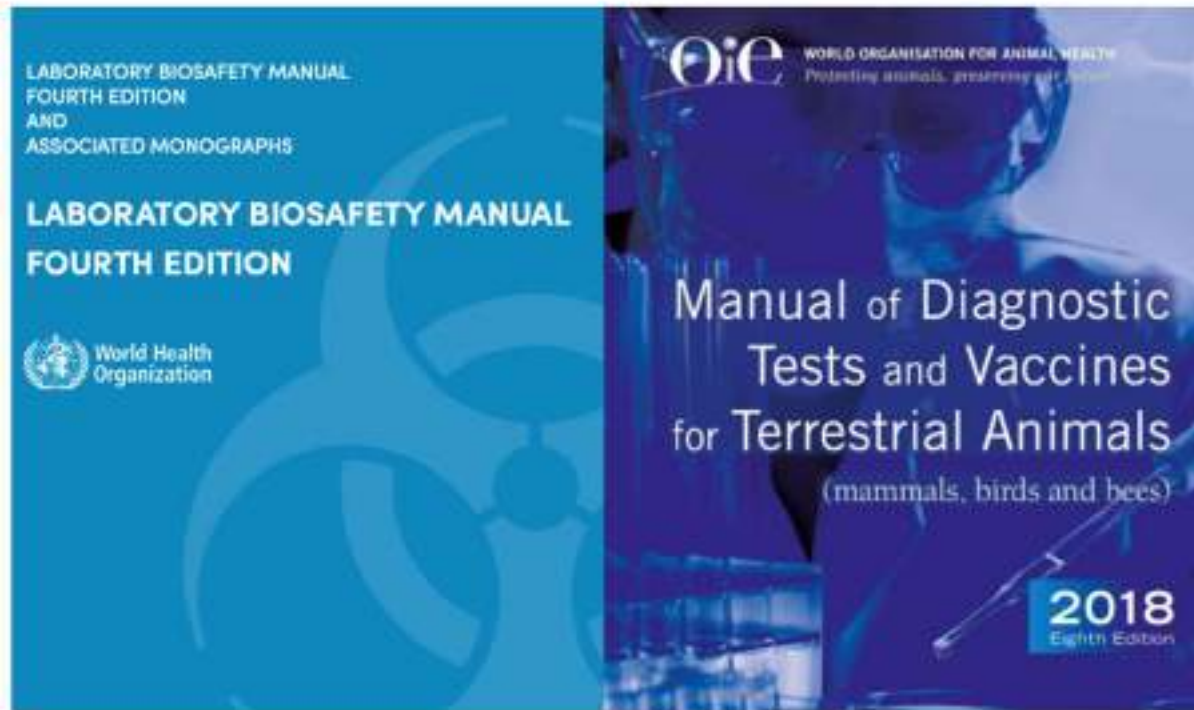
Principali riferimenti normativi



- **Direttiva 2000/54/CE** → Protezione dei lavoratori contro l'esposizione ad agenti biologici
- **Reg. (CE) n. 999/2001** → Disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili
- **Reg. (CE) n. 1069/2009** → Sottoprodotti di origine animale non destinati al consumo umano
- **Reg. (UE) n. 429/2016** → Normativa in materia di sanità animale
- **Reg. (UE) 625/2017** → Controlli ufficiali lungo la filiera agroalimentare
- **D.lgs. 81/2008** → Tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro
- **Legge 18/12/2020**
n. 176 → Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 28 ottobre 2020, n. 137 (...) e n. 149, recante ulteriori misure urgenti in materia di tutela della salute, sostegno ai lavoratori e alle imprese, giustizia e sicurezza, connesse all'emergenza epidemiologica da COVID-19.



Ulteriori fonti



<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240011311>

<https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>

<https://www.iss.it/documents/20126/45616/undici31web.pdf/45a90761-4924-3053-f68a-66f155db6974?t=1581103335118>



Riferimenti bibliografici

THE DESIGN OF MOLECULAR TOOLS IN RELATION TO PRIONS AND THEIR BIOSAFETY

frontiers
in Bioengineering and Biotechnology

EDITED BY: Maria Lurdes Pinto, Maria Anjos Pires, Leonor Orge and Jesus R. Requena

A Novel, Reliable and Highly Versatile Method to Evaluate Different Prion Decontamination Procedures

Hasier Eraña^{1,2†}, Miguel Ángel Pérez-Castro^{1†}, Sandra García-Martínez^{1,2}, Jorge M. Charco^{1,2}, Rafael López-Moreno¹, Carlos M. Díaz-Domínguez¹, Tomás Barrio¹, Ezequiel González-Miranda^{1,2} and Joaquín Castilla^{1,2*}

¹ Center for Cooperative Research in Biosciences (CIC bioGUNE), Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Bizkaia Technology Park, Derio, Spain, ² Atlas Molecular Pharma S. L., Bizkaia Technology Park, Derio, Spain, [†]IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

frontiers
in Bioengineering and Biotechnology

ORIGINAL RESEARCH
published: 29 October 2020
doi: 10.3389/fbioe.2020.580182



Biosafety Guidelines

Marlon L. Bayot¹, Faten Limaïem²

In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. 2021 Feb 4.

Affiliations + expand

PMID: 30725895 Bookshelf ID: N8K537210



Biosafety of Prions

Edoardo Bistaffa^{*,†}, Martina Rossi[†], Chiara M.G. De Luca^{*,‡}, Fabio Moda^{*,1}

[†]IRCCS Foundation Carlo Besta Neurological Institute, Milan, Italy

[‡]Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati (SISSA), Trieste, Italy

[‡]Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italy

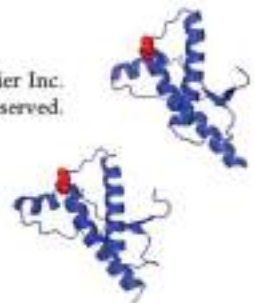
¹Corresponding author: e-mail address: fabio.moda@istituto-besta.it

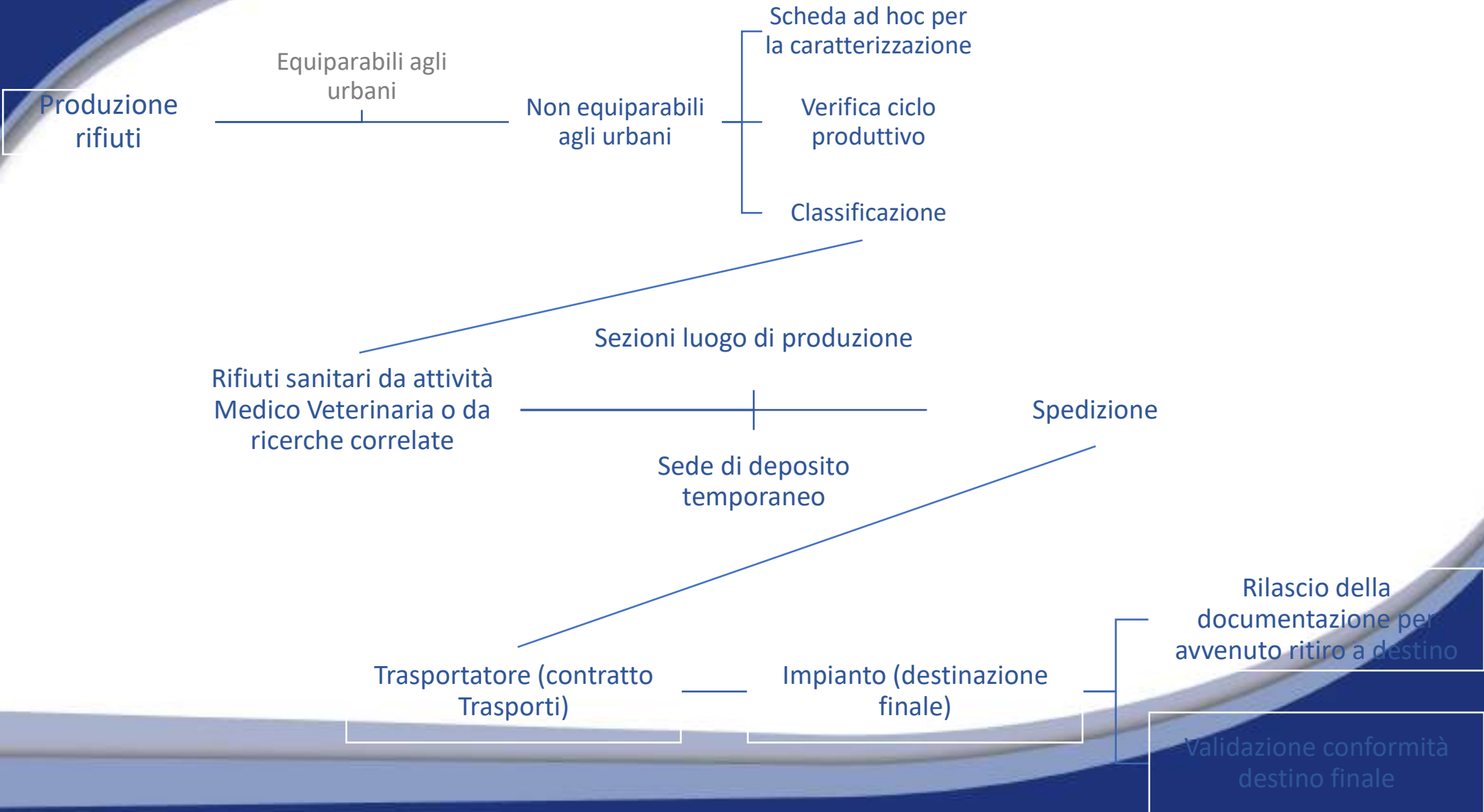
Progress in Molecular Biology and Translational Science, Volume 150

ISSN 1877-1173

<http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.06.017>

© 2017 Elsevier Inc.
All rights reserved.







istituto zooprofilattico sperimentale

del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta



J. Altara

Via Bologna, 148 - 10154 Torino - IT - Tel. +39 01126861
Pec: izsto@legalmail.it - web: www.izsplv.it